

Universidad de Barcelona
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisicoquímica

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona
Departamento de Química de Péptidos y Proteínas

Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer
Hospital Clínico de Barcelona
Servicio de Inmunología

Programa de doctorado "Medicaments, alimentació i salut"
Bienio: 2000-2002

Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)

Memoria presentada por M^a Teresa Pérez Escoda para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Directores:

Dra. Isabel Haro Villar
Investigador Científico
Dept. Química de Péptidos y Proteínas
IIQAB - CSIC

Dra. Guadalupe Ercilla González
Consultor
Servicio de Inmunología
IDIBAPS - Hospital Clínico

Tutor:

Dra. Montserrat Muñoz
Profesora asociada
Departamento de Fisicoquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona

M^a Teresa Pérez Escoda
Barcelona, marzo 2007

CAPÍTULO 4

Análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real.

Tecnología de resonancia de plasmón de superficie

4.1 Introducción a la técnica de resonancia del plasmón de superficie

La introducción a principios de los años 90 de una nueva tecnología de biosensores basada en el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*) ha permitido la visualización en tiempo real del proceso de interacción entre biomoléculas [175,176,177].

Uno de los instrumentos biosensores más empleados es el modelo BIAcore™ desarrollado por BIACORE AB (Uppsala, Suecia). Se define como biosensor un instrumento que combina, por un lado, un mecanismo biológico y, por el otro, un transductor que genera una señal reconocible en respuesta al proceso biológico [178]. El BIAcore™ utiliza un biosensor basado en la resonancia del plasmón de superficie y el sistema es capaz de monitorizar de forma precisa y en tiempo real la interacción entre una especie unida a la superficie del sensor (ligando) [179] y otra que circula en disolución (analito).

En los últimos años la técnica de SPR se ha utilizado para el estudio de una gran variedad de interacciones, entre las que destacan las interacciones antígeno-anticuerpo y las interacciones de biomoléculas con modelos de membrana, prueba de ello es el gran número de publicaciones aparecidas en los últimos años [180,181,182].

El sistema de detección de un instrumento de SPR está compuesto por un sistema óptico y por el chip sensor [183], en el cual tiene lugar el fenómeno de resonancia del plasmón de superficie y que está formado por un sustrato de vidrio en el que se deposita una lámina de oro de 50 nm de grosor sobre la cual se encuentra una matriz hidrófoba de 100 nm con un 2-3% de dextrano. Esta matriz constituye un medio compatible con las interacciones biomoleculares y permite la inmovilización de gran número de ligandos con bajos niveles de unión específica. El chip sensor forma parte de una unidad de microfluído por la cual circulan las disoluciones que interaccionarán con el ligando unido al chip. Este sistema de microfluído da lugar a cuatro celdas de flujo independientes sobre el chip sensor. Por el otro lado, el chip sensor está en contacto con el prisma del sistema óptico a través del cual se enfoca la luz cercana al infrarrojo y polarizada hacia el plano no modificado del chip sensor (Figura 4.1). La luz reflejada se analiza en un detector de diodos fijo y bidimensional.

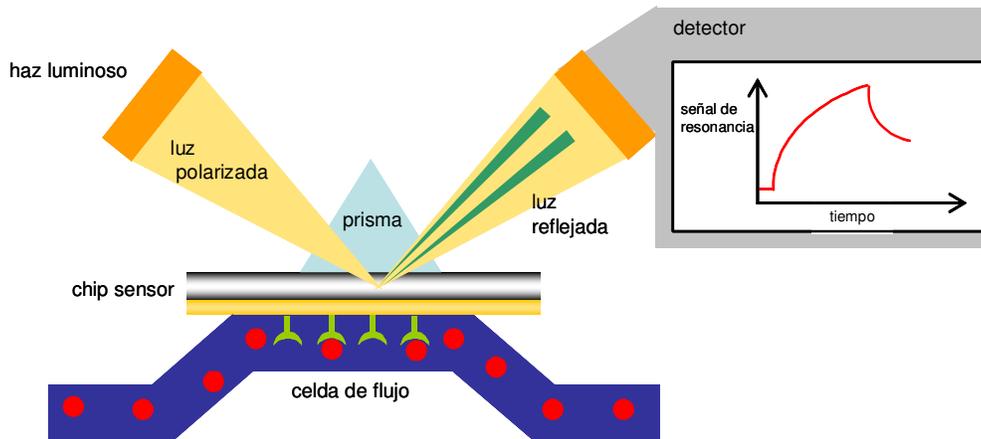


Figura 4.1. Fenómeno de la resonancia del plasmón de superficie. La resonancia del plasmón de superficie se produce por una reflexión total del haz de luz incidente al interactuar con los plasmones por lo que se observa una reducción de la intensidad de la luz reflejada.

Tal y como se observa en la Figura 4.1, el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie se produce cuando un haz de luz ilumina la interfase entre dos medios (en este caso vidrio y disolución acuosa) con distinto índice de refracción, entre los que se ha insertado una capa fina de metal (en este caso oro). La onda evanescente creada por la reflexión total interna interactúa con los electrones oscilantes o plasmones del metal, causando una disminución en la intensidad de la luz reflejada. El ángulo de resonancia al que se da este fenómeno es sensible al índice de refracción de la solución próxima al metal. Como la longitud de onda de la luz incidente y el índice de refracción del vidrio y el oro se mantienen constantes, el ángulo de resonancia variará solamente con los cambios en el índice de refracción de la fase acuosa, y estos cambios son debidos a variaciones en la masa al interactuar las biomoléculas en este medio.

Cuando se representan las variaciones del ángulo de resonancia (en unidades de resonancia, RU) frente al tiempo se obtienen los sensorgramas. 1000 unidades de resonancia equivalen a un incremento de 0.1 grados del ángulo de resonancia de plasmón. Para una proteína promedio, este valor corresponde a una variación en la concentración en la superficie de 1 ng mm^{-2} . En la Figura 4.2 se muestra un sensorgrama típico de interacción entre biomoléculas con los cambios que se producen en el chip durante el proceso. En la superficie de dextrano del chip sensor se inmoviliza una de las moléculas o ligando, al inyectar el analito en la celda de microflujo se produce la interacción entre ambos lo que da lugar a un aumento de la señal. La disociación empieza cuando se sustituye el ligando en circulación por el tampón de flujo. Finalmente, se inyecta una solución regeneradora que

elimina de la superficie el analito no unido covalentemente y el sensorgrama revierte a la línea de base inicial.

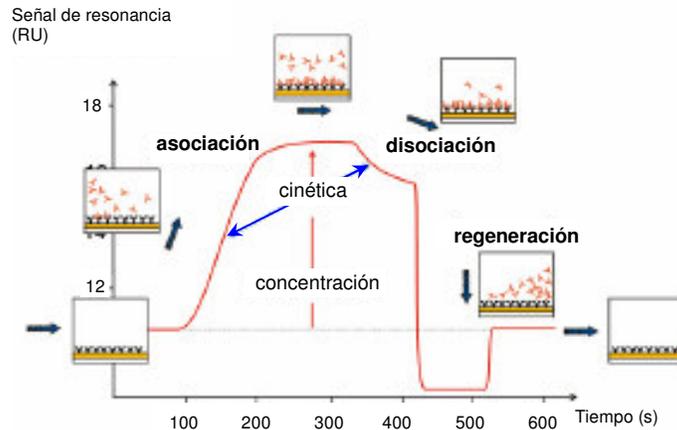


Figura 4.2. Sensorgrama esquemático de la interacción entre moléculas.

Entre las aplicaciones de la técnica de SPR destacan el estudio de identificación de epítopos, la determinación de patrones de interacción en la búsqueda de nuevas moléculas farmacológicamente activas, la determinación de constantes cinéticas de interacción entre biomoléculas [184,185], y más recientemente, los estudios conformacionales [186,187] y de interacción con modelos de membrana [188,189].

La utilización de la tecnología de biosensores para el análisis de la interacción antígeno-anticuerpo ha dado lugar a un gran número de publicaciones en los últimos años en los que se examina la viabilidad de ésta en la detección, en fluidos biológicos, de anticuerpos contra patógenos [190,191,192]. Comparada con ensayos serológicos convencionales, la técnica de SPR ha demostrado ser una valiosa herramienta de diagnóstico debido a que permite la detección en tiempo real y la monitorización de la interacción entre moléculas biológicamente activas sin necesidad de utilizar reactivos marcados, además de que permite que uno de los ligandos, inmovilizado en la superficie sensora, sea regenerado y reutilizado en múltiples análisis. Es importante remarcar también, que debido a que permite trabajar a flujos muy bajos, se reduce considerablemente el volumen de muestra requerido para el análisis a la vez que precisa tiempos cortos de análisis [193,194].

Dada la experiencia en nuestro grupo en la utilización de la técnica SPR, tanto en el análisis cinético de la interacción antígeno-anticuerpo [195], como en la detección de anticuerpos en sueros humanos, tanto contra el virus de la hepatitis A [196] como el virus GBV-C/HGV [92], se consideró de interés aplicar dicha técnica con la misma finalidad y poder, de este modo, estudiar su utilidad en el

diagnóstico de la infección por GBV-C/HGV utilizando los péptidos sintéticos presentados en este trabajo.

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron cuatro de las construcciones peptídicas estudiadas previamente por ELISA. Los péptidos fueron unidos covalentemente a la superficie del chip CM5, mediante la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo de la superficie del chip y los grupos amino de los péptidos. Una vez unidos los péptidos, se hicieron circular las muestras de suero por los canales en los que se encontraban inmovilizados los péptidos y se estudiaron las señales de resonancia obtenidas en cada caso. En la Figura 4.3 se representan esquemáticamente las diferentes etapas del ensayo.

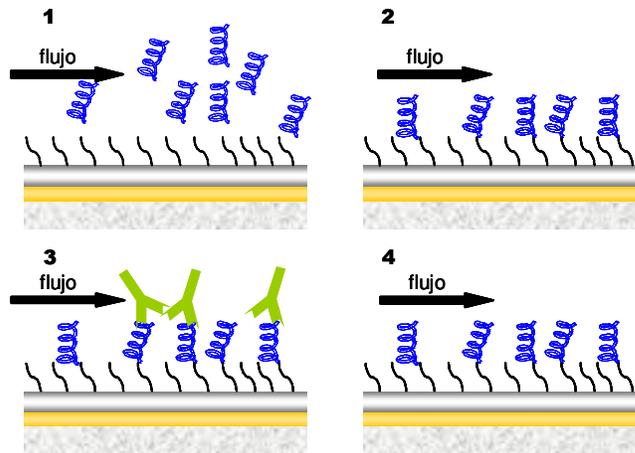


Figura 4.3. Esquema ilustrativo del análisis de la interacción antígeno anticuerpo sobre chips CM5. El proceso consiste en la inyección del péptido (1) y formación de un enlace covalente con la superficie (2). Posteriormente, se inyecta la muestra que contiene los anticuerpos (3) y se analiza el cambio en la señal de resonancia. Finalmente se lava la superficie para eliminar los anticuerpos, permaneciendo el péptido unido. De este modo la superficie está preparada para un nuevo ensayo (4).

4.2 Inmovilización de las secuencias NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2 sobre la superficie del chip CM5

Los estudios con estos péptidos se llevaron a cabo en un instrumento BIAcore™ 1000. Previamente a la inmovilización de las moléculas sobre la superficie, fue necesario realizar las denominadas pruebas de preconcentración electrostática con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo la unión posterior. En medio acuoso, el pKa de los grupos de la matriz de dextrano es próximo a 4. Durante la inmovilización mediante la formación del enlace

amida entre los grupos amino del péptido y los grupos activados en forma de éster de NHS, se suele trabajar a concentraciones bajas de ligando. Por ello, el tampón en el cual se diluye la muestra debe favorecer la interacción electrostática entre ésta y la matriz de dextrano de forma que se facilite la formación del enlace covalente. Para favorecer la preconcentración electrostática conviene diluir el ligando en tampones de baja fuerza iónica y con un pH por debajo del punto isoeléctrico (pI) de la molécula que se pretende inmovilizar. Para las cuatro secuencias se realizaron diferentes pruebas de preconcentración electrostática sobre las celdas de la matriz de dextrano sin activar. Se utilizó, en todos los casos, HBS-EP como tampón del sistema y el flujo de trabajo se fijó en $10 \mu\text{l min}^{-1}$.

Dado que el punto isoeléctrico teórico de la secuencia NS4b(8-22) es de 4.04, las pruebas de preconcentración se realizaron con el péptido diluido en una disolución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM a pH 3.5 y pH 3.1. Además de trabajar a distintos pH, las pruebas también se realizaron a distintas concentraciones de péptido comprendidas entre 30 y 128 μM . La concentración de péptido 128 μM en una disolución a pH 3.1 fue la que mostró un mejor perfil de unión electrostática, y por este motivo fue la que se utilizó en la inmovilización.

Una vez seleccionada la concentración adecuada y el pH óptimo, se procedió a inmovilizar el péptido al chip sensor (Figura 4.4). Los grupos carboxilos unidos a la matriz de dextrano se activaron por la inyección de 50 μl de una disolución de NHS 0.05 M y EDC 0.2 M en relación 1:1, posteriormente se inyectaron 50 μl de la disolución de péptido a la concentración y al pH escogidos. La señal de RU alcanzada fue de 789 RU, pero no se consideró suficiente, teniendo en cuenta que esta señal se reduce drásticamente tras la desactivación de los grupos carboxilos y posteriores lavados de la superficie con hidróxido sódico. Por este motivo se inyectaron 50 μl más de la disolución de péptido. La señal de resonancia tras esta segunda inyección alcanzó las 1050 RU, que se consideraron adecuadas, por lo que se desactivó la superficie inyectando 50 μl de una disolución de etanolamina 1 M.

Finalmente, el ligando no unido covalentemente a la matriz se eliminó tras una sucesión de lavados con NaOH 100 mM (pulsos de 60 segundos). La señal final de resonancia obtenida fue de 270 RU. Teniendo en cuenta la relación por la que se considera que una señal de resonancia de 1000 RU es equivalente a una concentración en la superficie de 1 ng mm^2 , la concentración de péptido en la superficie del chip al obtener 270 RU fue de 0.17 pmol mm^2 .

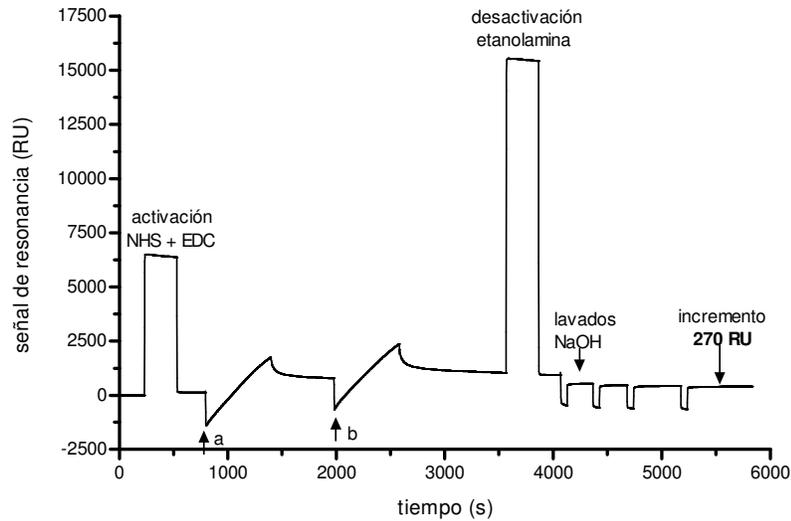


Figura 4.4. Sensorgrama de inmovilización de la secuencia NS4b(8-22) en la superficie del chip CM5. a) Primera inyección de 50 μ l de la disolución de péptido 128 μ M pH 3.1. b) Segunda inyección de péptido en las mismas condiciones.

Del mismo modo que para el péptido NS4b(8-22), para el péptido NS5a(112-126) también se realizaron pruebas de preconcentración electrostática. En este caso, el punto isoeléctrico teórico calculado para la secuencia fue de 4.46. Las pruebas de preconcentración se realizaron a pH 4.0 y 4.5 y en un rango de concentraciones que osciló entre 48 μ M y 480 μ M. El mejor perfil de preconcentración se obtuvo cuando el péptido se encontraba a una concentración de 480 μ M en la disolución amortiguadora de acetato sódico a pH 4.0. En la Figura 4.5 se muestra el sensorgrama obtenido para la inmovilización de la secuencia NS5a(112-126). La activación de la superficie de la matriz se llevó a cabo de manera idéntica que para el péptido NS4b(8-22). La señal de resonancia superó las 1100 RU tras una única inyección de 50 μ l de la disolución de péptido. Tras la desactivación de los grupos carbonilos libres y el lavado de la superficie para eliminar moléculas no unidas de manera covalente, la señal de resonancia se estabilizó en 318 RU, que corresponden a una concentración de péptido en la superficie sensora de 0.19 pmol mm^2 .

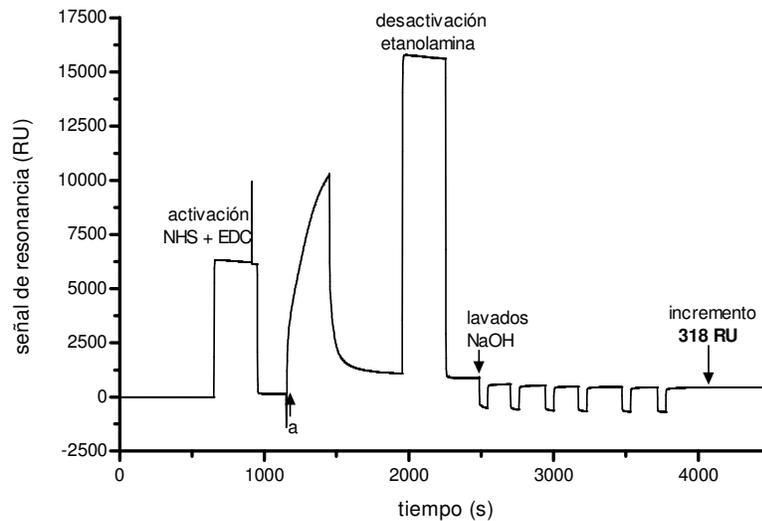


Figura 4.5. Sensorgrama de inmovilización de la secuencia NS5a(112-126) en la superficie del chip CM5. a) Inyección de 50 μ l de la disolución de péptido 480 μ M pH 4.0.

La inmovilización de las secuencias quiméricas se realizó de una forma muy similar. El pI teórico calculado para ambas secuencias fue de 4.10. Debido a la poca cantidad de producto del que se disponía no se realizaron estudios de preconcentración y se inmovilizaron directamente las moléculas, teniendo en cuenta los rangos de concentración y pH óptimos para inmovilizar las secuencias NS4b(8-22) y NS5a(112-126). Los péptidos se diluyeron en la disolución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM pH 3.5 hasta alcanzar una concentración de 120 μ M en ambos casos.

Para la inmovilización de la secuencia Qm1 la activación de la superficie tuvo lugar del mismo modo que en los casos anteriores, inyectando 50 μ l de una disolución de NHS y EDC en relación 1:1. Inmediatamente después se inyectaron 50 μ l de la disolución de péptido recién preparada. La señal de resonancia superó las 1360 RU. Tras la desactivación de los grupos carboxilo de la superficie mediante la inyección de etanolamina y los lavados sucesivos con NaOH, la señal de resonancia se estabilizó en 490 RU (Figura 4.6), correspondientes a una concentración de péptido en la superficie de 0.14 pmol mm^2 .

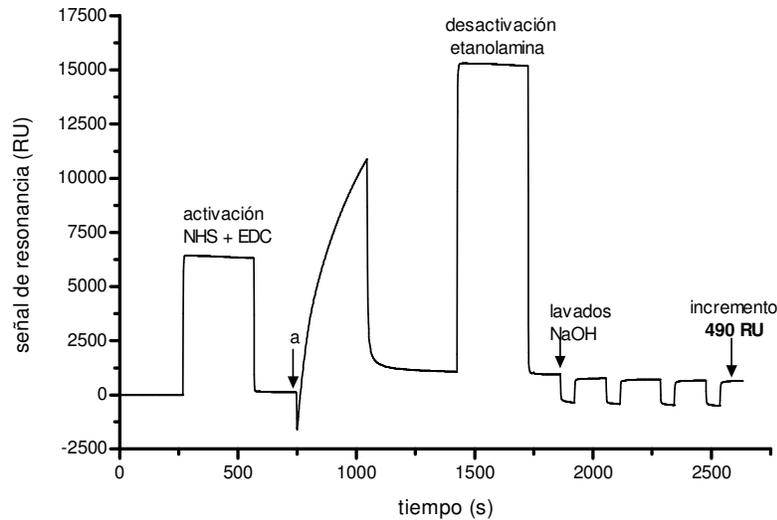


Figura 4.6. Sensorgrama de inmovilización de la secuencia Qm1 en la superficie del chip CM5. a) Inyección de 50 μ l de la disolución de péptido 120 μ M pH 3.5.

La inmovilización de la secuencia quimérica Qm2 tuvo lugar en las mismas condiciones que su homóloga, es decir con el péptido disuelto en la disolución de acetato de sodio 10 mM pH 3.5 a una concentración de 120 μ M. La activación de la superficie tuvo lugar del mismo modo por la inyección de 50 μ l de la mezcla activadora. Sin embargo, esta vez se varió el patrón de inyección de la muestra. Hasta ahora tras inyectar un volumen considerable de la muestra de péptido, unos 50 μ l, se habían obtenido incrementos considerables en la señal de resonancia, sin embargo, estos niveles disminuían considerablemente tras los ciclos de lavado con soluciones de gran fuerza iónica y de pH básico. Se pensó que este fenómeno sería debido a una acumulación de moléculas en la superficie, unidas únicamente por atracción electrostática a la superficie y que al hacer circular una disolución con una gran fuerza iónica, éstas eran arrastradas de la superficie. Inyectando estos volúmenes de péptido se hacía difícil poder predecir el nivel final de unión de péptido a la superficie.

A la vista de estos resultados, se planteó realizar inyecciones de menor volumen, de manera que el incremento en la señal de resonancia fuese progresivo. Así pues, una vez activada la superficie de dextrano, se inyectaron 20 μ l de la disolución de péptido. La señal de resonancia aumentó hasta 358 RU, se inyectó de nuevo un pequeño volumen de péptido (30 μ l), con lo que la señal de resonancia se incrementó ligeramente en 172 RU. Se repitió el proceso por dos veces más y al final de estas dos nuevas inyecciones, la señal de resonancia alcanzó el nivel de 800 RU. En este

punto, se llevó a cabo la desactivación de los grupos carboxilo y las posteriores inyecciones de NaOH, para eliminar el péptido que no se había unido de manera covalente. Al final del proceso la señal de resonancia se estabilizó en 390 RU (Figura 4.7). Esta señal corresponde a una concentración de péptido inmovilizado por unidad de superficie de 0.11 pmol mm².

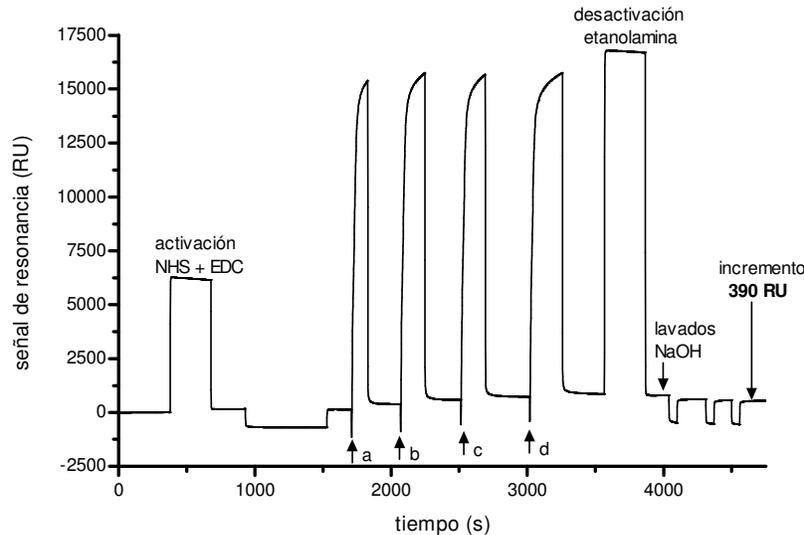


Figura 4.7. Sensorgrama de inmovilización de la secuencia Qm2 en la superficie del chip CM5. a) Inyección de 20 µl de la disolución de péptido 120 µM pH 3.5. b, c y d) Inyecciones de 30 µl más de la disolución de péptido.

Al comparar el perfil de inmovilización obtenido para la secuencia Qm1 y el perfil obtenido para la secuencia Qm2, puede observarse, que a pesar de que el volumen total de muestra inyectado es superior para el péptido Qm2, 110 µl respecto a 50 µl gastados para el péptido Qm1, el incremento progresivo en la señal de resonancia permite un control más preciso del nivel de inmovilización final, ya que el descenso en la señal de resonancia tras la desactivación y los ciclos de lavado es menos drástico que cuando se produce una única inyección de muestra.

4.2.1 Detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV mediante la técnica de resonancia del plasmón de superficie utilizando los péptidos sintéticos NS4b(8-22), NS5a(112-126) y las construcciones quiméricas Qm1 y Qm2.

Los resultados obtenidos en el ensayo de ELISA basado en péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV descritos en el capítulo 2, reflejaron la utilidad de estas construcciones como antígenos en el diagnóstico de la infección por este virus. Con la finalidad de

estudiar la posible aplicación de la técnica de SPR como herramienta diagnóstica y poder compararla con la técnica clásica del enzimoimmunoensayo se analizaron los sueros de los pacientes hemodializados con los péptidos inmovilizados.

Se estudió la interacción entre la muestra de suero y los péptidos inmovilizados en la superficie del chip al inyectar 100 μl del suero diluido 100 veces en el tampón del sistema (HBS-EP) a un flujo de 10 $\mu\text{l min}^{-1}$. Para minimizar las interacciones no específicas entre los distintos componentes de los sueros y la superficie de dextrano de la superficie del chip, al tampón de dilución de las muestras se le añadió un 0.1% de carboximetildextrano (CMD) [196]. Asimismo, también se estudió la interacción inespecífica de las muestras con la superficie haciéndolas circular por un canal del chip que no contenía péptido, si bien su superficie había sido activada y desactivada del mismo modo que los canales que contenían los péptidos inmovilizados.

Para cada péptido, se calculó un valor de corte por encima del cual las muestras se consideraron positivas. Este valor de corte se estableció como el valor promedio de las respuestas obtenidas por las muestras procedentes de donantes voluntarios (controles negativos) más dos desviaciones estándar.

En la Figura 4.8 pueden observarse, a modo de ejemplo, los sensorgramas obtenidos para dos muestras positivas y dos muestras negativas al hacerlas circular por los canales en los que se encuentran unidos los péptidos NS4b(8-22) y NS5a(112-126).

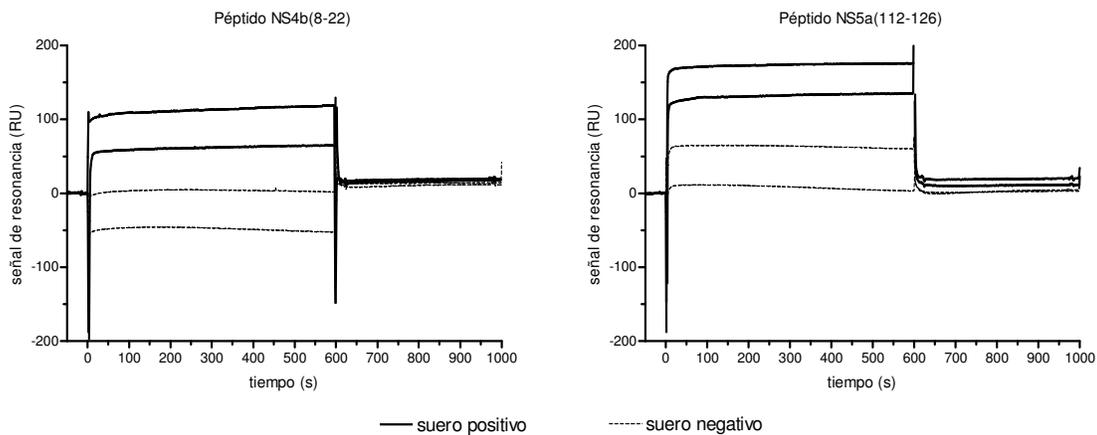


Figura 4.8. Sensorgramas obtenidos al inyectar sueros hemodializados positivos y negativos sobre los canales en los que se encuentran unidas las secuencias NS4b(8-22) y NS5a(112-126).

Tal y como puede observarse, los sueros, tanto los positivos como los negativos, alcanzaron niveles de RU superiores de respuesta para el péptido NS5a(11-126) en comparación con el péptido

NS4b(8-22), aun así, para los dos péptidos, las respuestas obtenidas para los sueros negativos fueron inferiores a las obtenidas por las muestras positivas.

En la Figura 4.9 se muestran las respuestas obtenidas por los sueros seleccionados al circular por los canales que contienen los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2.

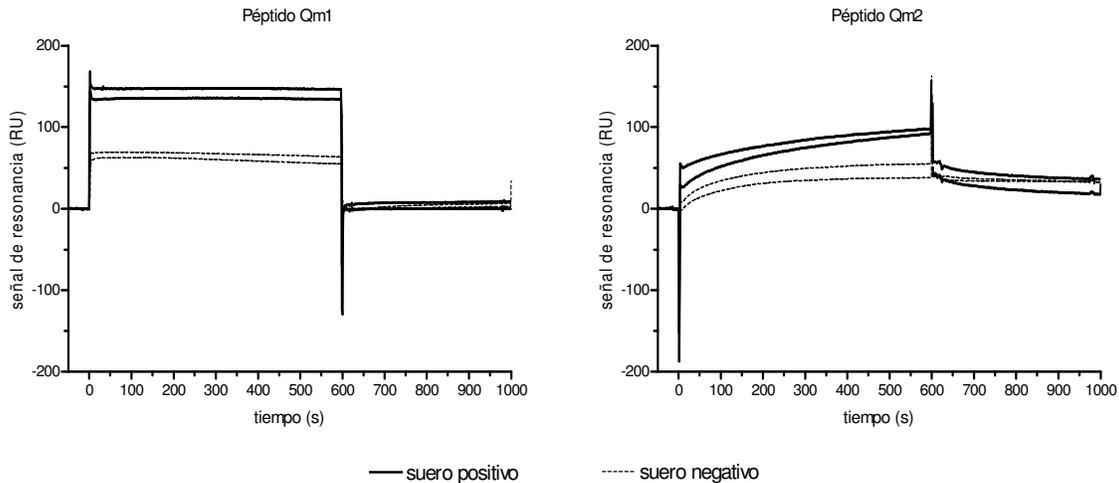


Figura 4.9. Sensorgramas obtenidos al inyectar sueros hemodializados positivos y negativos sobre los canales en los que se encuentran unidas las secuencias Qm1 y Qm2.

Del mismo modo que para las secuencias monoepitópicas se observaron diferencias en los niveles de respuesta obtenidos por parte de los sueros positivos y las muestras de suero negativas. Menos apreciables fueron las diferencias entre dichos sueros al hacerlos circular por el canal en el que se había inmovilizado el péptido quimérico Qm2. En general, los sueros positivos alcanzaron niveles de RU superiores a las alcanzadas por los sueros negativos, por lo que puede considerarse que la diferencia en la respuesta es debida a la interacción de los anticuerpos anti-GBV-C/HGV presentes en los sueros y los péptidos.

En la Figura 4.10 se muestran las respuestas obtenidas en los análisis de SPR con los péptidos y el panel de 35 sueros de pacientes hemodializados. La cuantificación de la interacción péptido-anticuerpo se determinó a partir del nivel de RU alcanzado un segundo después de finalizar la inyección. En la gráfica se representan los valores de la respuesta obtenida divididos por el valor de corte calculado para cada péptido (respuesta/CO). Las muestras con un cociente superior a la unidad se consideraron positivas.

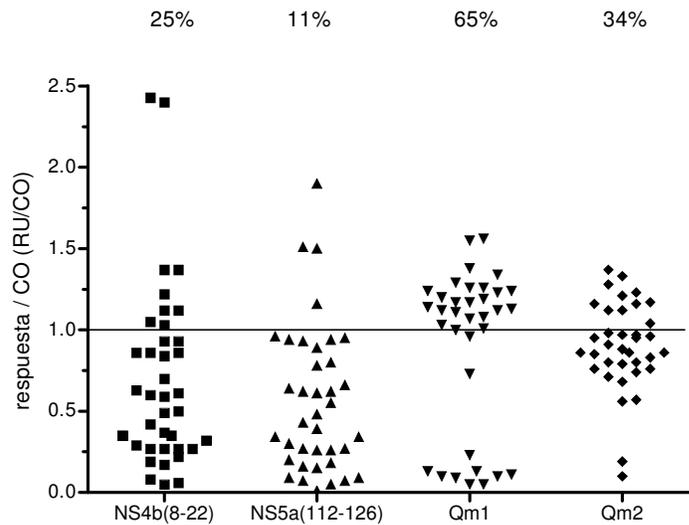
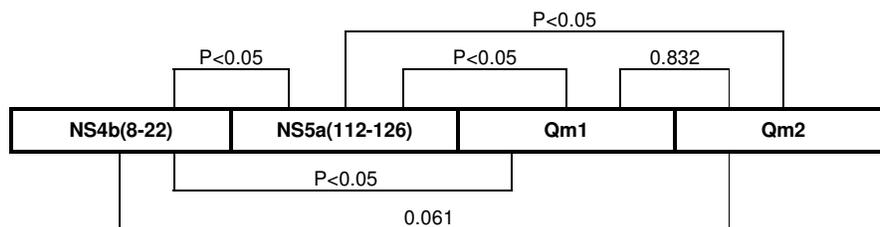


Figura 4.10. Reactividad por SPR de los sueros procedentes de pacientes hemodializados con los péptidos NS4b(8-22), NS5a(112-126) y sus correspondientes secuencias quiméricas, Qm1 y Qm2. Las muestras se consideraron positivas cuando el cociente respuesta / CO fue superior a la unidad.

Como puede observarse, las cuatro secuencias estudiadas reconocieron anticuerpos en las muestras testadas. Las secuencias NS4b(8-22) y NS5a(112-126) detectaron como positivos el 25% y el 11%, respectivamente, de los sueros testados por SPR. Los resultados obtenidos, igual que en la técnica de ELISA, indicaron una mayor reactividad de los péptidos quiméricos en comparación con las secuencias monoepitópicas. Mientras el péptido quimérico Qm1 mostró una reactividad significativamente superior ($P < 0.05$, ver Tabla 4.1) respecto a las secuencias monoepitópicas, al alcanzar porcentajes de positividad del 65%, el péptido quimérico Qm2 aunque también presentó una reactividad superior que las secuencias NS4b(8-22) y NS5a(112-126), no superó el 34% de positividad.

Tabla 4.1. Valores P calculados tras comparar las respuestas de los sueros con cada uno de los péptidos estudiados. Se estableció un intervalo de confianza del 95%, por lo que valores de $P < 0.05$ indican diferencias significativas entre los grupos comparados.



4.2.2 Comparación de las técnicas de ELISA y SPR

En esta tesis se ha estudiado la capacidad de las secuencias sintéticas NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2 para detectar anticuerpos anti-GBV-C/HGV presentes en el suero de muestras humanas empleando dos técnicas distintas. En ambas técnicas, los péptidos se encuentran unidos de manera covalente a una superficie sólida derivatizada, el poliestireno en el caso de la técnica de ELISA, y una matriz hidrófoba de dextrano en el caso de la técnica de SPR. Sin embargo el desarrollo posterior del análisis es distinto en ambos casos y la técnica de SPR presenta algunas ventajas en este sentido.

En la técnica de ELISA, las muestras se incuban en presencia de los péptidos durante un periodo de tiempo y se elimina posteriormente la fracción que no se ha unido al péptido. La determinación de la unión péptido-anticuerpo se realiza mediante la adición de un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente, y posteriormente del sustrato del enzima. Sin embargo, en la técnica de SPR ninguna de las biomoléculas necesita marcadores específicos con lo cual se eliminarían las alteraciones en la actividad biológica que resultan del proceso de conjugación [197,198]. Otra de las ventajas que presenta la técnica de SPR frente a la técnica de ELISA es que cada etapa del proceso, se visualiza directamente lo que permite detectar de una manera inmediata si alguno de los componentes del ensayo es defectuoso. Por el contrario, en los ensayos que utilizan anticuerpos marcados, únicamente es posible detectar la última etapa y no se obtiene información alguna del curso de la secuencia de la reacción que ha tenido lugar. Si el resultado de ELISA es dudoso, se debe analizar cada uno de los componentes del ensayo separadamente para descubrir la etapa causante del error [199].

En la Tabla 4.2 se presentan los resultados de la comparación entre las reactividades obtenidas por la técnica de ELISA y por la técnica de SPR para 35 de los sueros procedentes de pacientes sometidos a hemodiálisis.

Tabla 4.2 Comparación de las reactividades de los sueros de pacientes hemodializados frente a los péptidos NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2 mediante las dos técnicas estudiadas, ELISA y SPR. Porcentaje de reactividad entre paréntesis.

	NS4b(8-22)	NS5a(112-126)	Qm1	Qm2
técnica de ELISA	8/35 (23)	11/35 (31)	14/35 (40)	16/35 (46)
técnica de SPR	9/35 (25)	4/35 (11)	23/35 (65)	12/35 (34)
ELISA vs SPR	P = 0.455	P=0.053	P=0.013	P=0.298

Tal y como puede observarse, existe una buena correlación entre los resultados obtenidos por las técnicas de ELISA y SPR. Tanto el péptido NS4b(8-22) como el NS5a(112-126) reconocieron anticuerpos en un número similar de muestras y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas ($P=0.455$ y $P=0.053$). La secuencia quimérica Qm2, también mostró una capacidad antigénica similar tanto por la técnica de enzoinmunoensayo como por la técnica de la resonancia del plasmón de superficie ($P=0.298$). Sin embargo, la secuencia Qm1, mostró una mayor sensibilidad por la técnica de SPR en comparación con la técnica de ELISA ($P<0.05$).

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que las secuencias seleccionadas para este estudio tienen utilidad en el diagnóstico de la infección pasada causada por el virus GBV-C/HGV tanto por la técnica clásica del inmunoensayo como por la técnica de la resonancia del plasmón de superficie. Estos resultados confirman a la vez, que la combinación de dos o más epítomos en la misma molécula mejora la capacidad para reconocer anticuerpos. Existen trabajos publicados en los que se utiliza con éxito la técnica de SPR para reconocer anticuerpos presentes en muestras de suero [194]. Otros autores han empleado quimeras peptídicas relacionadas con el HIV en la detección de anticuerpos mediante la técnica de SPR en el suero de pacientes infectados [200,201].

4.3 Inmovilización de la construcción ramificada MAP₄ E2-NS5a sobre la superficie del chip CM5

Todos los experimentos realizados con la construcción quimérica ramificada, MAP₄ E2-NS5a, se llevaron a cabo en un instrumento BIAcore T100. Igual que se ha comentado en el apartado anterior, se inmovilizó la secuencia peptídica sobre la superficie de dextrano del chip CM5. Con la finalidad de estudiar la relación entre la concentración de péptido en la superficie y la capacidad para reconocer anticuerpos anti-GBV-C/HGV, se inmovilizó el péptido MAP₄ E2-NS5a en la superficie a distintas concentraciones.

Antes de iniciar la inmovilización de la molécula se llevaron a cabo los correspondientes estudios de preconcentración electrostática con la finalidad de obtener las condiciones más idóneas para alcanzar la señal de resonancia deseada en cada caso.

El tampón de flujo del sistema empleado fue HBS-EP y el flujo de trabajo fue de $10 \mu\text{l min}^{-1}$ para todos los experimentos. El pI teórico calculado para el MAP₄ E2-NS5 fue de 4.4 por lo que se realizaron los ensayos de preconcentración a distintas concentraciones del péptido empleando en todos los casos tampón acetato de sodio 10 mM pH 4.0. En la Figura 4.9 se muestran los perfiles de

respuesta obtenidos al inyectar el péptido sobre una celda de flujo de la matriz de dextrano no activada. Al ser la molécula solo parcialmente soluble en el tampón de trabajo se añadió un volumen de DMSO correspondiente a un 1% del volumen final de la disolución de péptido. A pesar que el índice de refracción es superior cuando se trabaja con disolventes orgánicos, este hecho no afecta a la concentración final de péptido unida en la superficie [202]. En la Figura 4.11 se muestran los perfiles obtenidos en las pruebas de preconcentración en las que se analizó la respuesta obtenida por la molécula para las concentraciones comprendidas entre 12.6 nM y 1.26 μ M.

La concentración más baja de las estudiadas, 12.6 nM, resultó ser demasiado diluida para conseguir un nivel de inmovilización adecuado, y fue descartada. Las otras tres concentraciones se utilizaron para conseguir los distintos niveles de inmovilización perseguidos.

De este modo, una vez activada la superficie del chip, se inyectó en cada canal el volumen necesario de la disolución de péptido a la concentración adecuada hasta alcanzar el incremento deseado en la señal de resonancia.

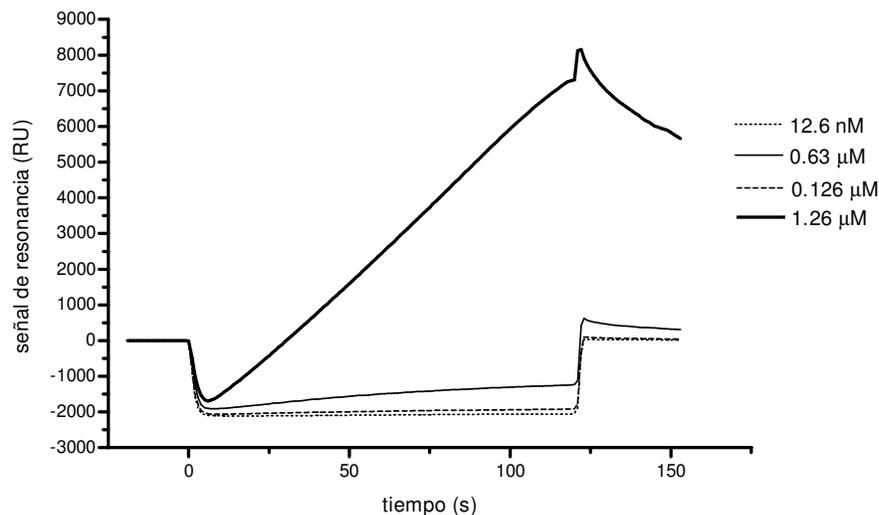


Figura 4.11. Estudio de preconcentración del péptido MAP₄ E2-NS5a a distintas concentraciones en una disolución tamponada de pH 4.0

Finalmente, se consiguió tener en los distintos canales una concentración de péptido unido por unidad de superficie de 0.034, 0.091 y 0.24 pmol mm⁻², que representaron un incremento en la señal de resonancia de 276, 723 y 1928 unidades de resonancia, respectivamente. La inyección de un total de 67 μ l de la disolución de péptido de 0.126 μ M permitió conseguir una concentración baja de péptido en la superficie del chip. La inyección de 34 μ l de la disolución de péptido 0.63 μ M supuso

un incremento de 723 RU, mientras que para alcanzar las 1928 RU de péptido unido en la superficie se inyectaron 6 μl de una disolución de péptido 1.26 μM (Figura 4.12).

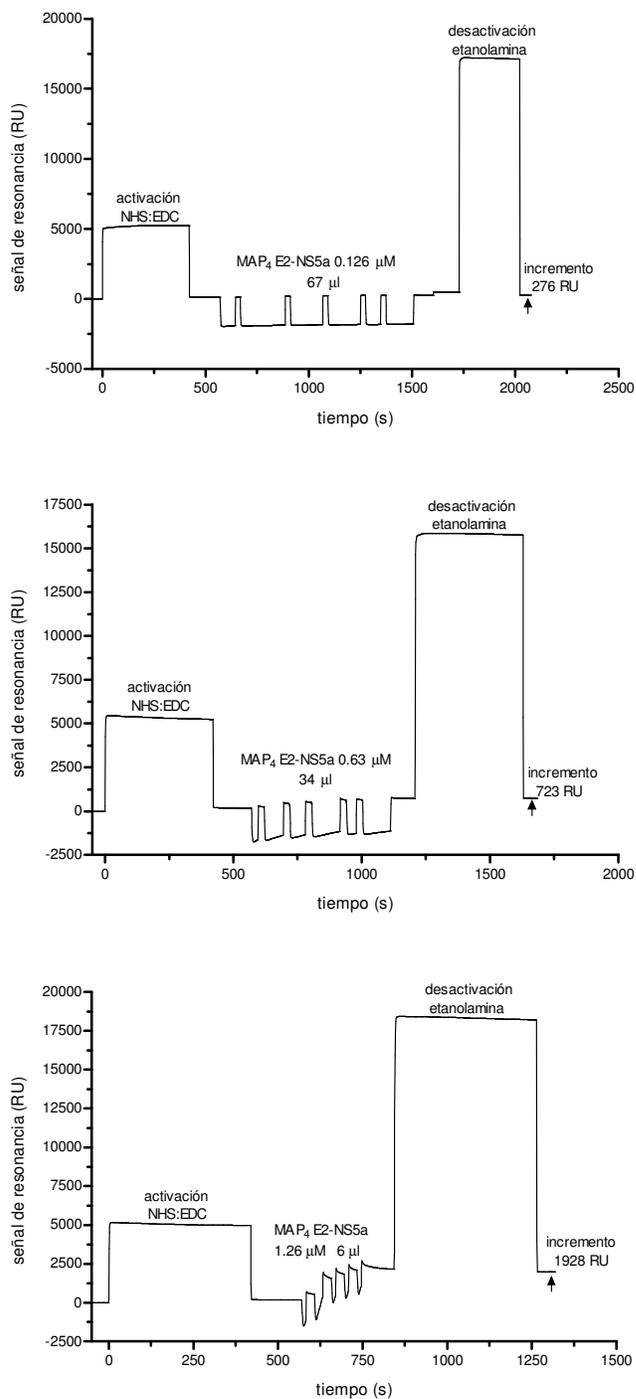


Figura 4.12. Sensorgramas de inmovilización del péptido MAP₄ E2-NS5a a tres concentraciones diferentes sobre la superficie del chip CM5.

4.3.1 Detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV mediante la técnica de resonancia del plasmón de superficie utilizando la construcción multiepitópica ramificada MAP₄ E2-NS5a

Una vez inmovilizada correctamente la molécula a las concentraciones deseadas sobre la superficie de dextrano se estudió la relación entre la concentración de péptido unido a la superficie del chip y la capacidad de reconocer anticuerpos anti-GVB-C/HGV. Se hicieron circular sueros procedentes de pacientes con hepatitis crónica y poder estudiar de este modo la capacidad diagnóstica de la construcción ramificada por la técnica de SPR. Las muestras se diluyeron 50, 100 y 200 veces en el tampón de flujo del sistema, HBS-EP al que se le añadió un 0.1% de CMD.

En la Figura 4.13 se representan las respuestas obtenidas por los sueros testados a las tres diluciones distintas estudiadas al circular por cada uno de los tres canales en los que el péptido se encontraba inmovilizado. Como puede observarse, el nivel de respuesta alcanzado por los sueros varió en función de la concentración de péptido unido a la superficie del chip. Una mayor concentración de péptido inmovilizado en la superficie sensora proporcionó un mayor nivel de respuesta; de modo que los niveles de respuesta alcanzados por los sueros al circular por el canal con una concentración más elevada de MAP₄ E2-NS5a unido a la fase sólida, 0.24 pmol mm⁻², fueron significativamente superiores ($P < 0.05$) que al circular por los canales en que la concentración de péptido fue de 0.034 y 0.091 pmol mm⁻².

La respuesta alcanzada por los sueros también está en relación directa con la dilución, y disminuyó al aumentar la dilución de la muestra. A las diluciones 1/100 y 1/200 no se observaron diferencias significativas en las respuestas obtenidas por los sueros positivos y negativos, independientemente de la concentración de péptido unida a la superficie sensora. Sin embargo, al inyectar las muestras de suero más concentradas, diluidas solamente 50 veces en el tampón de flujo, sí pudieron observarse diferencias entre las muestras positivas y las negativas, aunque únicamente fueron significativas ($P = 0.010$) al circular por el canal con una mayor concentración de péptido unido (1928 RU, 0.24 pmol mm⁻²).

Los resultados obtenidos para la construcción ramificada MAP₄ E2-NS5a empleando la técnica de ELISA (apartado 2.3.4) demostraron que la combinación de más de un epítipo en la misma molécula mejoraba sensiblemente la capacidad para reconocer anticuerpos. Sin embargo, la escasa reactividad de la construcción tetramérica cuando fue analizada mediante la técnica de SPR pone de manifiesto que las condiciones utilizadas en los ensayos de SPR no resultaron ser óptimas para realizar la correcta detección de los anticuerpos.

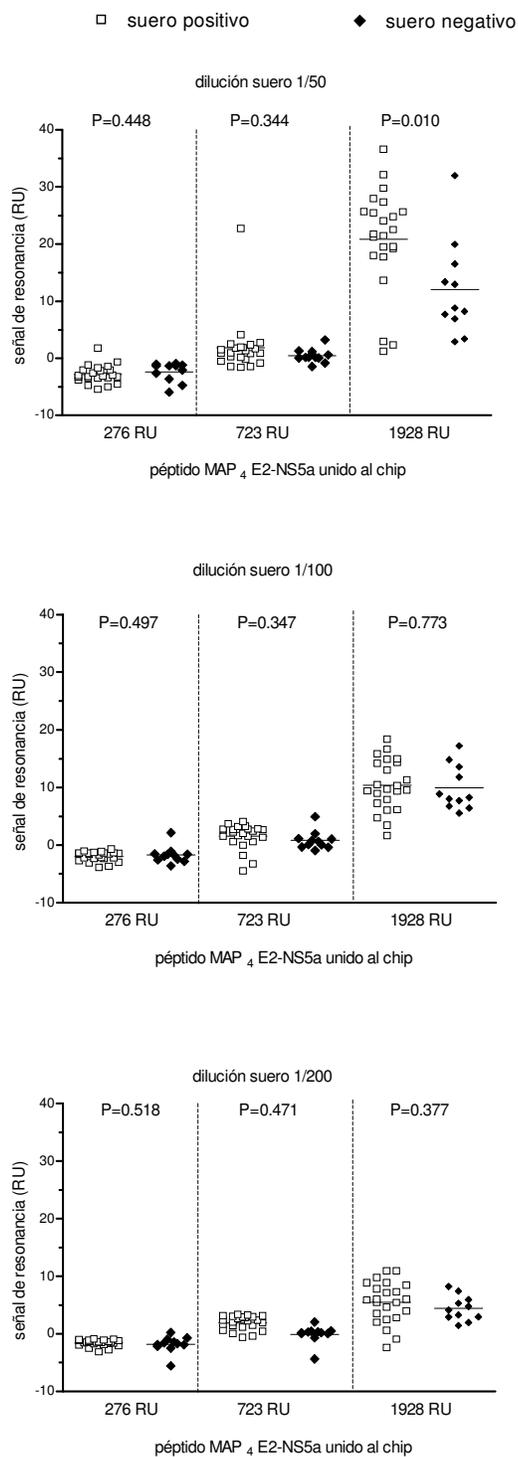


Figura 4.13. Reactividad por SPR de los sueros procedentes de pacientes con hepatitis crónica con la construcción tetramérica MAP4 E2-NS5a. Se muestran las tres diluciones estudiadas para los sueros y la respuesta obtenida en cada canal con una concentración distinta de péptido inmovilizado.

La debilidad de los resultados obtenidos cuando se utilizan construcciones tetraméricas como inmunoreactivos por la técnica de la resonancia del plasmón de superficie pone de manifiesto una serie de dificultades que presenta esta técnica para el análisis de la interacción antígeno-anticuerpo y que deben ser solventadas. En primer lugar, los pequeños incrementos en el índice de refracción de muchas moléculas biológicas hace necesario tener una alta concentración local de lugares de unión en la superficie del sensor, generalmente del orden de 100 μM . Por otro lado, el reactivo móvil debe ser transportado eficientemente a través de la superficie sensora reactiva. Como consecuencia, las curvas que resultan de medir el proceso de unión están potencialmente gobernadas por limitaciones en el transporte de masa del reactivo móvil a través de la superficie sensora y por problemas de impedimento estérico en el entorno de los lugares de unión de dicha superficie [203].

Sería posible también justificar la baja capacidad de esta macromolécula para reconocer anticuerpos anti-GBV-C/HGV por la técnica de SPR, debido al tipo de estrategia empleada en la inmovilización de ésta en la superficie de los chips de dextrano. A pesar de que en los ensayos de ELISA la unión covalente a la superficie a través de los grupos amina de la molécula ha dado buenos resultados en el reconocimiento de anticuerpos, está descrito que la inmovilización de este tipo de construcciones en la superficie de dextrano a través de un grupo tiol previamente añadido en el extremo de la misma, preserva la conformación del péptido [200]. Tam *et al.* [71] describen también la modificación de los MAPs con cadenas de ácidos grasos para poder de ese modo, adsorberlos directamente a la superficie hidrófoba de los chips HPA o bien la incorporación de residuos de Gly entre los epítomos y el núcleo de polilisinas que incremente la separación entre los epítomos [204].

4.4 Recapitulación

En este capítulo se han expuesto y discutido los resultados obtenidos tras utilizar la técnica de la resonancia del plasmón de superficie en la detección de la interacción antígeno-anticuerpo. Los péptidos, tanto las secuencias lineales como la construcción tetramérica ramificada, se unieron satisfactoriamente de manera covalente sobre la superficie sensora, sobre la que se hicieron circular las muestras de suero.

Los resultados obtenidos por SPR mostraron la utilidad de esta técnica para la detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV empleando como antígenos secuencias peptídicas lineales como las estudiadas NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2. Es importante destacar la buena correlación existente entre las reactividades obtenidas por las dos técnicas que se estudian en esta tesis, el ensayo de inmunoenzima y la tecnología de resonancia del plasmón de superficie.

Por el contrario, al estudiar la capacidad de la construcción MAP₄ E2-NS5a para detectar anticuerpos empleando la técnica de SPR, la reactividad obtenida fue sensiblemente menor que la obtenida por la técnica de ELISA, lo que sugiere que no se llegaron a optimizar los niveles de inmovilización requeridos ni se lograron las condiciones óptimas en las que se debe desarrollar el análisis por SPR con este tipo de macroconstrucciones.

Se demuestra la utilidad de la técnica de SPR como herramienta diagnóstica, si bien todavía deben realizarse múltiples ensayos con el fin de optimizar todos los parámetros que influyen en el análisis.